



⑪ Numéro de publication:

0 155 427
A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑰ Numéro de dépôt: 84402677.3

⑤① Int. Cl.⁴: **C 12 Q 1/04**
C 12 N 1/00

⑱ Date de dépôt: 20.12.84

③① Priorité: 09.02.84 FR 8402000

④③ Date de publication de la demande:
25.09.85 Bulletin 85/39

⑧④ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE GB IT LI NL SE

⑦① Demandeur SOCIETE D'APPLICATIONS
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
HOECHST-BEHRING
260 avenue Napoléon Bonaparte
F-92500 Rueil Malmaison(FR)

⑦② Inventeur: Demiaux, Jean-Bernard
4 Rue Pierre Berteau
F-61300 L'Aigle(FR)

⑦② Inventeur: Gallie, Jean-Claude
Tour Mermoz L'Horloge
F-61300 L'Aigle(FR)

⑦② Inventeur: Spieser, Claude
46 Tour Jules Romains La Madeleine
F-61300 L'Aigle(FR)

⑦② Inventeur: Volle, Pierre-Jean
141 Boulevard Pereire
F-75017 Paris(FR)

⑦④ Mandataire: Orès, Bernard et al,
Cabinet ORES 6, avenue de Messine
F-75008 Paris(FR)

⑤④ Nouveau milieu de culture, solide, à délitement rapide, prêt à l'emploi et procédé pour le préparer.

⑤⑦ La présente invention est relative à un nouveau milieu de culture.

Le nouveau milieu de culture se caractérise en ce qu'il se présente sous la forme d'un comprimé contenant tous les composants nécessaires pour effectuer l'analyse souhaitée, ledit comprimé étant pourvu d'un agent de délitement.

Application : Milieux de culture solides à délitement rapide, prêts à l'emploi.

EP 0 155 427 A1

La présente invention est relative à un nouveau milieu de culture, solide, à délitement rapide et prêt à l'emploi.

Dès 1909, DOERR en Allemagne avait desséché
5 sur plaques de verre des milieux de culture pour pouvoir les conserver. Quelques années plus tard FROST (aux USA) avait effectué une étude systématique de la dessiccation des milieux de culture. Actuellement, les milieux solides sont préparés d'une manière industrielle. Par exemple, la
10 maison DIFCO de Détroit propose un nombre considérable de milieux souvent très complexes, à l'état desséché. L'emploi de tels milieux nécessite toutefois de nombreuses manipulations : il faut peser, stériliser, répartir stérilement, dissoudre.

15 Ces différentes opérations sont souvent longues, certaines pouvant être plus ou moins complètes et leur succession source d'erreurs lors de dosages ultérieurs.

La présente invention s'est par conséquent
fixée pour but de pourvoir à un milieu solide, prêt à
20 l'emploi, ne nécessitant aucune pesée, aucune manipulation de stérilisation et de répartition, d'une solubilisation parfaite, rapide et totale.

La présente invention a pour objet un nouveau milieu de culture, solide, caractérisé en ce qu'il se
25 présente sous forme d'un comprimé contenant tous les composants nécessaires pour effectuer l'analyse souhaitée, ledit comprimé étant pourvu d'un agent de délitement.

Selon un mode de réalisation particulièrement
30 avantageux de l'objet de la présente invention, l'agent de délitement est un agent effervescent composé d'une association acide tartrique-bicarbonate de sodium et/ou carbonate de lysine selon les proportions : 1:2 à 1:4.

35 Selon une modalité avantageuse de ce mode de

réalisation, la teneur d'agent effervescent est comprise entre 5 et 50 % et de préférence entre 13 et 22 % du poids total du comprimé.

5 Ce mode de réalisation est très avantageux : dans ces conditions, au moment d'addition de l'eau de dissolution le comprimé flotte et les bulles dégagées qui peuvent être gênantes pour les mesures optiques éventuelles se regroupent par le fait même à la surface.

10 Conformément à l'invention, le comprimé est formé d'une quantité de divers réactifs composant le milieu, quantité juste nécessaire et suffisante pour une opération analytique unitaire, le poids dudit comprimé étant compris entre 0,01 g et 5 g.

15 Selon un mode de réalisation avantageux de l'objet de l'invention, le comprimé peut être rendu stérile.

Le comprimé selon l'invention peut contenir si on le désire, un réactif d'inhibition de croissance de tout microorganisme (bactéries, virus, champignon, levure...) à différentes concentrations.

20 Selon un autre mode de réalisation, le comprimé selon l'invention peut contenir des indicateurs de croissance (indicateurs d'oxydo-réduction, indicateur de pH, indicateurs colorés de croissance, etc).

25 Selon encore un autre mode de réalisation de l'objet de l'invention, le comprimé peut contenir des réactifs d'identification des caractéristiques métaboliques (tels que par exemple des substrats enzymatiques mannitol, lactose, etc).

30 Conformément à l'invention, le comprimé contient en outre, un ou des agent(s) lubrifiant(s) qui peut par ailleurs être un stabilisant (du benzoate de sodium et/ou du P.E.G. 6000 par exemple).

Les avantages de tels Milieux de culture solides sont remarquables : ils peuvent être tamponnés au pH désiré, optimal pour une croissance donnée : ils sont immédiat-
35 ment , tels quels , prêts à l'emploi , très maniables et

d'une solubilité rapide et totale ; ils conviennent aussi bien à la croissance de bactéries, virus, champignons, levures, qu'à la croissance cellulaire.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation du milieu solide conforme à la présente invention, caractérisé en ce que l'on procède à une pluralité de prémélanges successifs de tous les constituants du milieu avant d'effectuer la compression et, éventuellement la stérilisation.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, un, plusieurs ou la totalité des constituants entrant dans la composition du milieu sont séchés par lyophilisation.

L'invention pourra être mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de compositions et de préparation du milieu conforme à la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que les différents exemples de mise en oeuvre qui seront décrits ci-après, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, mais n'en constituant en aucune manière une limitation.

EXEMPLE I. Comprimé contenant un antibiotique

Tableau I

		Minima	Maxima
25	Antibiotique	0,0003	10
	Milieu de culture lyophilisé contenant l'antibiotique	0,6	90
30	Acide tartrique	3,33	15
	Bicarbonate de Sodium	6,67	40
	Benzoate de Sodium	0	10
	Milieu de culture	50	95

35 Les quantités sont indiquées en pourcentage (poids sur poids).

EXEMPLE II. Composition de comprimés contenant de la Gentamycine à différentes concentrations.

TABLEAU II

GENTAMYCINE	0,000333	0,000666	0,001333	0,00266	0,005333	0,01066	0,02133
MILIEU DE CULTURE LYOPHILISE CONTENANT LA GENTAMYCINE	0,624	1,248	2,496	4,992	9,984	19,968	39,936
ACIDE TARTRIQUE	4,333	4,333	4,333	4,333	4,333	4,333	4,333
BICARBONATE DE SODIUM	10,666	10,666	10,666	10,666	10,666	10,666	10,666
BENZOATE DE SODIUM	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
MILIEU DE CULTURE	79,386	78,773	77,493	75,000	70,000	60,000	40,000

Les quantités sont indiquées en pourcentage.

35 30 25 20 15 10 5

EXEMPLE III. Composition de comprimés contenant de la Gentamycine
à des concentrations allant de 0,125 µg à 8 µg par comprimé et
de raison 2.

TABLEAU III

GENTAMYCINE	0,125	0,250	0,500	1	2	4	8
MILIEU DE CULTURE							
LYOPHILISE CONTENANT LA GENTAMYCINE	234	469	938	1 875	3 750	7 500	15 000
ACIDE TARTRIQUE	1 625	1 625	1 625	1 625	1 625	1 625	1 625
BICARBONATE DE SODIUM	4 000	4 000	4 000	4 000	4 000	4 000	4 000
BENZOATE DE SODIUM	1 875	1 875	1 875	1 875	1 875	1 875	1 875
MILIEU DE CULTURE	29 766	29 531	29 062	28 125	26 250	22 500	15 000
POIDS D'UN COMPRIME	37 500	37 500	37 500	37 500	17 500	37 500	37 500

Les quantités sont indiquées en microgrammes.

EXEMPLE IV. Composition centésimale de milieux
de culture.

Milieu_1

	Bio-trypcase	39,58
5	Bio-soyase	13,19
	Chlorure de sodium	10,55
	Bicarbonate de sodium	10,55
	Sulfite de sodium	0,53
	Acide tartrique	4,29
10	Cystine	1,85
	Glucose	14,51
	Benzoate de sodium	<u>4,95</u>
		100,00

Milieu_2

15	Peptone de caséine	45,33
	Peptone de farine de soja	8,00
	Glucose	6,67
	Chlorure de sodium	13,33
	Bicarbonate de sodium	10,67
20	Acide tartrique	4,33
	Phosphate dipotassique	6,67
	Benzoate de sodium	<u>5,00</u>
		100,00

Milieu_3

25	Bio-trypcase	37,13
	Bio-soyase	12,38
	Chlorure de sodium	9,90
	Sulfite de sodium	0,50
	Acide tartrique	4,93
30	Cystine	1,73
	Glucose	13,61
	Benzoate de sodium	2,47
	P.E.G. 6000	2,48
	Carbonate de lysine	<u>14,87</u>
35		100,00

EXEMPLE V. Exemple de préparation d'un mélange destiné à la fabrication de comprimés de milieu de culture renfermant de la Ticarcilline dosée de 4 µg à 64 µg par comprimé.

5 On prépare un mélange contenant 16 µg d'antibiotique dans 1,875 mg.

Pour garantir une répartition homogène de l'antibiotique dans le milieu de culture, on opère par trois prémélanges successifs dans un mélangeur rapide (par exemple Lödige, Stephan, Henschel).

10 Exemple : 0,500 grammes d'antibiotique + 5 grammes de milieu de culture ; on mélange 30 secondes en mélangeur rapide.

15 On additionne à ce premier mélange 25 grammes du même milieu de culture et on mélange 30 secondes environ en mélangeur rapide.

On additionne à ce deuxième mélange 28,61 grammes du même milieu de culture ; on mélange 30 secondes environ en mélangeur rapide.

20 Le mélange obtenu contient 16 µg d'antibiotique dans 1,875 mg.

Le Tableau IV suivant indique les quantités de ce mélange qui entrent dans la composition de comprimés titrant respectivement 4 µg, 8 µg, 16 µg, 32 µg, 64 µg de Ticarcilline par comprimé terminé de 37,5 mg.

Les quantités sont indiquées en mg.

TABLEAU IV

30	: Mélange contenant l'antibiotique	: 0,469	: 0,938	: 1,875	: 3,750	: 7,500	:
	: Acide tartrique	: 1,625	: 1,625	: 1,625	: 1,625	: 1,625	:
	: Bicarbonate de sodium	: 4,000	: 4,000	: 4,000	: 4,000	: 4,000	:
	: Benzoate de sodium	: 1,875	: 1,875	: 1,875	: 1,875	: 1,875	:
35	: Milieu de culture	: 29,540	: 29,000	: 28,125	: 26,250	: 22,500	:

Il résulte de la description qui précède que
quels que soient les modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application adoptés, l'on obtient des milieux solides qui présentent par rapport aux milieux antérieurement connus des avantages importants, dont certains ont déjà été mentionnés dans ce qui précède, et notamment :

- le comprimé, très maniable et très soluble, peut être destiné à la reconstitution de milieux de culture solides, semi-solides ou liquides ;

- le comprimé est particulièrement adapté pour contenir par exemple les antibiotiques ou les antifongiques à différentes concentrations ;

- Le comprimé peut être préparé à partir de tout milieu de culture pour bactéries, levures, champignons, virus et cellules ;

- le comprimé permet l'utilisation d'un système de lecture optique dans d'excellentes conditions et de ce fait permet la réalisation de toute technique microbiologique et notamment la détection et la numération à partir d'un échantillon quelconque : sérum, urine, liquide céphalo-rachidien, liquide de ponction, produit laitier, eau, etc... ;

- le comprimé à délitement rapide permet la reconstitution de milieux prêts à l'emploi pour la détermination d'un antibiogramme, d'une concentration minimale inhibitrice, d'une identification et d'une caractérisation du microorganisme par étude différentielle de croissance ;

- le comprimé conforme à la présente invention, grâce à sa parfaite et rapide solubilité permet de réaliser un milieu de culture (pour bactéries, virus, levures, champignons...et cellules) prêt à l'emploi dans des délais très brefs par simple addition d'eau distillée.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent

0155427

9

d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDECATIONS

1°) Nouveau milieu de culture, solide, caracté-
risé en ce qu'il se présente sous forme d'un comprimé
contenant tous les composés nécessaires pour effectuer
5 l'analyse souhaitée, ledit comprimé étant pourvu d'un
agent de délitement, dont la teneur est comprise entre
5 et 50%, et de préférence entre 13 et 22%, du poids
total du comprimé.

2°) Milieu selon la revendication 1, caracté-
10 risé en ce que l'agent de délitement est un agent effe-
vescent composé d'une association acide tartrique-
bicarbonate de sodium et/ou carbonate de lysine selon
les proportions 1:2 à 1:4.

3°) Milieu selon l'une quelconque des reven-
15 dications précédentes, caractérisé en ce qu'il est formé
d'une quantité de divers réactifs composant le milieu,
quantité juste nécessaire et suffisante pour une opé-
ration analytique unitaire, le poids dudit comprimé
étant compris entre 0,01 g et 5 g.

20 4°) Milieu selon l'une quelconque des reven-
dications précédentes, caractérisé en ce qu'il peut
être rendu stérile.

5°) Milieu selon l'une quelconque des reven-
dications précédentes, caractérisé en ce qu'il peut
25 contenir, si on le désire, un réactif d'inhibition de
croissance de tout microorganisme (bactéries, virus,
champignon, levure...) à différentes concentrations.

6°) Milieu selon l'une quelconque des reven-
dications précédentes, caractérisé en ce qu'il peut
30 contenir des indicateurs de croissance (indicateurs
d'oxydo-réduction, indicateur de pH, indicateurs colo-
rés de croissance).

7°) Milieu selon l'une quelconque des reven-
dications précédentes, caractérisé en ce qu'il peut conte-
35 nir des réactifs d'identification des caractéristiques

métaboliques (tels que des substrats enzymatiques, mannitol, lactose).

5 8°) Milieu selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, un ou des agent(s) lubrifiant(s) qui peut par ailleurs être un stabilisant (du benzoate de sodium et/ou du P.E.G. 6000).

10 9°) Procédé de préparation du milieu solide selon les revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on procède à une pluralité de prémélanges successifs de tous les constituants du milieu avant d'effectuer la compression et, éventuellement, la stérilisation.

15 10°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'un, plusieurs ou la totalité des constituants entrant dans la composition du milieu, sont séchés par lyophilisation.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0155427

Numero de la demande

EP 84 40 2677

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
Y	THE OXOID MANUAL OF CULTURE MEDIA, INGREDIENTS AND OTHER LABORATORY SERVICES, 3e édition, section 1, 1969, Oxoid Ltd., pages 9-18, Londres, GB; "Introduction advantages and use of oxoid media" * Page 9, paragraphe 3; page 10, lignes 1-10; page 14, paragraphes C, D *	1	C 12 Q 1/04 C 12 N 1/00
Y	DE-A-2 220 065 (MICROBIOLOGICAL ASSOCIATES INC.) * Page 9, lignes 14-26; revendications 5, 9 *	1	
A		3, 4	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, volume 57, no. 1, 9 juillet 1962, colonne 969b, Columbus, Ohio, US; Z.I. BRYKOVA et al.: "Use of sodium bicarbonate and tartaric acid in tablets", & Med. Prom. SSSR, 15, no. 12, 43-4(1961) * Abrégé en entier *	1, 2	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4) C 12 Q C 12 N
Y	FR-A-2 281 068 (A. TODD) * Revendications 1-3 *	1, 2	
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 22-05-1985	Examineur GRIFFITH G.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

OSB Form 1503 03 82



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0155427

Numero de la demand

EP 84 40 267

Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Categorie	Citation du document avec indication en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
Y	FR-A-2 170 923 (LABORATOIRE U.P.S.A.) * Revendication 5 *	2	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
Le present rapport de recherche a ete etabli pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 22-05-1985	Examineur GRIFFITH G.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X	particulièrement pertinent à lui seul		
Y	particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		
A	arrière-plan technologique		
O	divulgation non-écrite		
P	document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			